PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **08-163986**
(43)Date of publication of application : **25.06.1996**

(51)Int.Cl.

```
   C12N 15/09
   C12Q  1/04
   C12Q  1/68
// C12N  1/21
  (C12N 15/09
   C12R  1:19   )
  (C12Q  1/68
   C12R  1:19   )
  (C12N  1/21
   C12R  1:19   )
```

(21)Application number :	**06-312261**	(71)Applicant :	**RES DEV CORP OF JAPAN** **IMAMOTO FUMIO** **TAKARA SHUZO CO LTD** **FURUSAWA MITSURU** **FUJITSU LTD**
(22)Date of filing :	**15.12.1994**	(72)Inventor :	**IMAMOTO FUMIO** **ISHINO YOSHIZUMI** **FURUSAWA MITSURU** **DOI HIROFUMI**

(54) DNA REPLICATION MODEL IN ESCHERICHIA COLI

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a DNA replication model having such function that a recombinant plasmid with a reporter gene connected to is transfected into a mismatched base calibration factor-deleted host bacterium and the difference of the mutation incidence for the reporter gene in its replication is detected as the character difference for the host bacterium.

CONSTITUTION: A recombinant plasmid prepared by connecting a reporter gene such as a mutant gene of a drug-resistant gene to a plasmid where a DNA replication is advanced in one-way fashion from a replication starting point is transfected into a mismatched base calibration factor-deleted host bacterium such as KH (1379CdnaQ49), recA+ strain of Escherichia coli KH1380 having a mutation in DNA polymerase III&epsi; factor, and the difference of the mutation incidence for the reporter gene in the respective replication of the double- stranded DNA of the recombinant plasmid is detected as the character difference for the host bacterium, thus obtaining the objective DNA replication model intended to examine whether mutation incidence frequency differ between the

BEST AVAILABLE COPY

discontinuous and continuous replications of a genome DNA to certify the mutational disequilibrium theory.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]	06.12.2001
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	
[Date of registration]	
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報**（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平8－163986

(43)公開日　平成８年(1996)６月25日

(51)Int.Cl.⁶	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ	技術表示箇所
Ｃ１２Ｎ　15/09				
Ｃ１２Ｑ　1/04		6807−4B		
1/68	Ｚ	9453−4B		
		9162−4B	Ｃ１２Ｎ　15/ 00	Ａ
			(Ｃ１２Ｎ　15/ 00	Ａ

審査請求　未請求　請求項の数３　ＯＬ　（全　５　頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6−312261

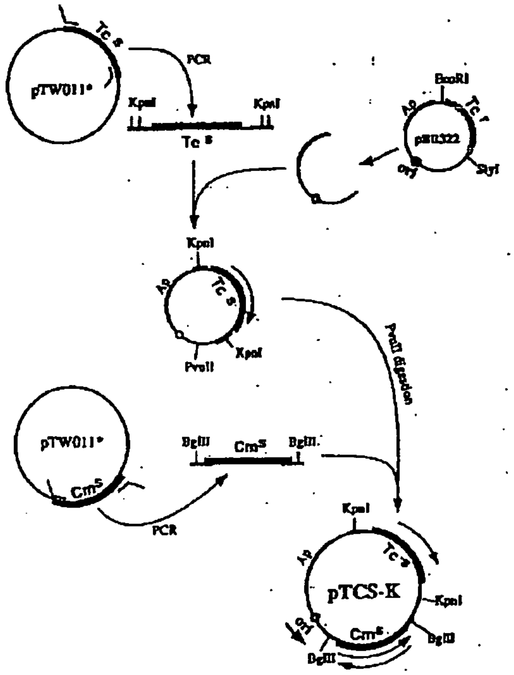
(22)出願日　平成６年(1994)12月15日

(71)出願人　390014535
新技術事業団
埼玉県川口市本町４丁目１番８号
(71)出願人　594204837
今本　文男
大阪府吹田市古江台１丁目９の３
(71)出願人　591038141
寳酒造株式会社
京都府京都市伏見区竹中町609番地
(74)代理人　弁理士　西澤　利夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　大腸菌におけるＤＮＡ複製モデル

(57)【要約】
【構成】　ＤＮＡ複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドにレポーター遺伝子を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入し、組換え体プラスミドの２本鎖ＤＮＡの各々の複製時に生じるレポーター遺伝子の変異発生率の差を、宿主菌の形質の相違として検出することを特徴とす大腸菌におけるＤＮＡ複製モデル。
【効果】　ゲノムＤＮＡの分裂・複製時における突然変異発生率が、連続（ leading）合成と不連続（ lagging）合成とで異なるという変異不均衡説が生物系において証明される。これによって、進化工学に新たな可能性が拓かれる。また、このＤＮＡ複製モデルの構成を利用して、レポーター遺伝子の代わりに有用遺伝子を接続すれば、その変異配列を効率良く得ることが可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項１】　ＤＮＡ複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドにレポーター遺伝子を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入し、組換え体プラスミドの２本鎖ＤＮＡの各々の複製時に生じるレポーター遺伝子の変異発生率の差を、宿主菌の形質の相違として検出することを特徴とす大腸菌におけるＤＮＡ複製モデル。

【請求項２】　レポーター遺伝子が、薬剤耐性遺伝子の変異遺伝子である請求項１のＤＮＡ複製モデル。

【請求項３】　組換え体プラスミドを導入する宿主菌が、ＤＮＡポリメラーゼIII ε因子に変異を有する大腸菌ＫＨ１３８０のｒｅｃＡ$^+$株であるＫＨ１３７９（ｄｎａＱ４９）である請求項１または２のＤＮＡ複製モデル。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】この発明は、大腸菌におけるＤＮＡ複製モデルに関するものである。さらに詳しくは、この発明は、ゲノムＤＮＡの不連続（lagging)複製と連続（leading)複製とでは変異の発生頻度が異なるか否か、もし異なるとすればどの程度の違いが存在するのかを生物的に証明すことのできるＤＮＡ複製モデルに関するものである。

【０００２】

【従来の技術とその課題】生物の多様な進化は、その構造や機能をコードする遺伝子ＤＮＡの突然変異によってもたらされている。従来、このような突然変異は、２本鎖ＤＮＡの分裂・複製時に、各々の鎖に同じ割合で生じると考えられてきた。ところが、２本のＤＮＡ鎖に突然変異が均等に生じるとすると、最初のＤＮＡ配列をそのまま継承する子孫が途中で消失してしまう。環境に変化がない時には同じ形質の生物が生き残るはずであるが、この変異均等説では説明に矛盾が生じる。

【０００３】これに対して、この発明の発明者等は、２本鎖ＤＮＡの分裂・複製時における突然変異の発生率は２本の新生鎖間で不均衡であり、一方が親鎖のＤＮＡ配列をほぼそのまま継承し、他方により多くの変異が蓄積されるとする「変異不均衡説」を提唱している。この説に従えば、環境に変化がない時にはＤＮＡ変異の少ない遺伝情報を受け継いだ個体が生き残り、一方、環境の変動に対してはより適応的な変異を持つ個体が選択されて進化が生じることになる。事実、この発明の発明者等は、この考えに基づいて突然変異がどのように生じるかをコンピュータシミュレーションしたところ、遺伝子が分裂・複製を繰り返しながら世代を経ていくうちに、従来の定説よりもはるかに多様な遺伝子を残せることを確認している。また、分裂・複製時に一方の新生鎖に生じる変異が他方よりも１００倍以上多ければ、最初のＤＮＡ配列と同じ配列がいつまでも継承され続けることを確認してもいる（J. Theor. Bio., 157, p127, 1992)。

【０００４】さらにまた、この変異不均衡説は、ゲノムＤＮＡの複製機構によってもその信憑性が見事に裏付けられている。すなわち、平行２本鎖からなる遺伝子ＤＮＡは塩基の相補性を利用して複製を行うが、両方の親鎖をそれぞれ鋳型とする２本の新生鎖の合成は、触媒する酵素の特性により５’→３’の一方向に限られる。ところが、親鎖である２本鎖ＤＮＡの分裂は任意の起点から始まり、一方向に開列が進行するため、開列の進む方向と合成の方向が一致する新生鎖は簡単な酵素等で触媒されて切れ目なく連続的に合成されるが、開列方向と合成方向が逆になる新生鎖は、岡崎フラグメントを一つ一つ連結しながら不連続的に合成されることになる。当然のことながら、連続的な合成に比べて、不連続な合成にはより複雑な機構が介在することになり、塩基の相補性に誤りが発生する確率が高くなることは容易に想像される。

【０００５】このように、変異不均衡説は、従来の理論では説明できなかった生物の多様な進化の形態を極めて合理的に説明することができ、しかもゲノムＤＮＡの複製機構の面からも充分な根拠を有する優れた理論であると評価されている。しかしながら、これまでのところ、分裂・複製後のＤＮＡ変異が、連続鎖（leading 鎖）よりも不連続鎖（lagging 鎖）で多く生じていることを生物系で実証した例はない。もしこの説が生物学的に証明されれば、その不均衡な変異発生率を人為的に制御することも可能となり、それによって、生物の進化の速度を急速に速めて有益な生物個体を効率的に創出しようとする進化工学に新たな途を拓くことができるものと期待される。

【０００６】この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、ゲノムＤＮＡの不連続（lagging)複製と連続（leading)複製とにおける変異発生頻度の不均衡性を実証的に示すことのできるモデル系を提供することを目的としている。

【０００７】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、ＤＮＡ複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドにレポーター遺伝子を接続した組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子を欠く宿主菌に導入し、組換え体プラスミドの２本鎖ＤＮＡの各々の複製時に生じるレポーター遺伝子の変異発生率の差を、宿主菌の形質の相違として検出することを特徴とす大腸菌におけるＤＮＡ複製モデルを提供する。

【０００８】以下、この発明の構成と、その好ましい態様について説明する。この発明のＤＮＡ複製モデルでは、ＤＮＡ複製が複製起点から一方向に進行するプラスミドにレポーター遺伝子を接続した組換え体プラスミドを一つの構成要件とする。すなわち、プラスミドは相補的な２本鎖の環状ＤＮＡであり、その分裂・複製が１箇

所の複製起点から一方向に進行すれば、例えば内側のＤＮＡ鎖は５’→３’方向に連続的な娘鎖（leading 鎖）を合成するが、外側のＤＮＡ鎖から合成される娘鎖は３’→５’方向の不連続鎖（lagging 鎖）となる。そこで、このようなプラスミドに、レポーター遺伝子として、例えば薬剤耐性へと変異しうる薬剤感受性遺伝子を接続して組換え体プラスミドを作成する。その際に、遺伝子のｍＲＮＡがleading 鎖から転写される組換え体プラスミドと、lagging 鎖から転写される組換え体プラスミドとを作成し、それぞれを大腸菌に導入して薬剤耐性菌の出現率の差をとれば、leading 合成とlagging 合成とにおける変異発生頻度の違いを検出することができる。すなわち、変異不均衡説が正しければ、lagging 鎖により多くの変異が生じ、その結果としてlagging 鎖からｍＲＮＡを転写する組換えプラスミドを導入した大腸菌がより多く薬剤耐性へと変異すると考えられる。

【０００９】あるいはまた、２種類の薬剤感受性遺伝子をプラスミドに接続して、一方をleading 鎖から転写させ、他方をlagging 鎖から転写させるようにしてもよい。この場合に、leading 鎖から転写される遺伝子よりもlagging 鎖から転写される遺伝子の変異率が高いとすれば、大腸菌は一方の薬剤にのみ耐性を示すようになると考えられる。

【００１０】さらに、この発明のＤＮＡ複製モデルでは、上記の組換え体プラスミドを、ミスマッチ塩基の校正因子に変異を有する宿主菌に導入して変異を誘導することを構成要件としてもいる。このような変異菌としては、ＤＮＡポリメラーゼIII ε因子に変異を有する大腸菌ＫＨ１３７９（ｄｎａＱ４９）を例示することができる。すなわち、様々な生物種において一回のＤＮＡ複製で塩基のミスマッチが生じる確率は１塩基対当たり10^{-10} 以下であると見積もられているが、ｄｎａＱ４９株ではこの確率が10^{3} から10^{5} 倍も増加する。従って、このｄｎａＱ４９株において上記の組換え体プラスミドを分裂・複製させることによって、leading 合成とlagging 合成とにおける変異発生頻度の違いをさらに明瞭なものとすることができる。

【００１１】以下、実施例として、この発明のＤＮＡ複製モデルの具体例と、その試験結果について詳細に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【００１２】

【実施例】プラスミドｐＢＲ３２２の ColE1型複製起点と２種類の薬剤感受性遺伝子（クロラムフェニコール感受性遺伝子：Ｃｍ^{s} 、テトラサイクリン感受性遺伝子：Ｔｃ^{s} ）を有する組換え体プラスミドｐＴＣＳ－Ｋを、図１の工程に従って作成した。この組換え体ｐＴＣＳ－Ｋは、ｐＴＷＳ０１１から切り出したＣｍ^{s} を含む１３３４ｂｐのＤＮＡ断片およびＴｃ^{s} を含む１３７５ｂｐの断片を、ｐＢＲ３２２のアンピシリン耐性遺伝子（Ａｐ^{R} ）と複製起点（ｏｒｉ）を含む断片（２９９２ｂｐ）に接続したものである。

【００１３】なお、Ｃｍ^{s} を含む断片については、その接続方向を変え、図２（Ａ）に示したｐＴＣＳ－Ｋ１９群（Ｋ－１９、Ｋ－２、Ｋ－４７、Ｋ－３１）と、図２（Ｂ）に示したｐＴＣＳ－Ｋ２０群（Ｋ－２０、Ｋ－１、Ｋ－４４、Ｋ－３４）を作成した。すなわち、この組換え体ｐＴＣＳ－Ｋは、複製によって内側のＤＮＡ鎖が lagging合成され、外側が leading合成される。従って、Ｃｍ^{s} 断片の接合方向が逆転することにより、ｐＴＣＳ－Ｋ１９群は lagging鎖からＣｍ^{s} を転写し、一方、ｐＴＣＳ－Ｋ２０群は leading鎖からＣｍ^{s} を転写する。なお、Ｔｃ^{s}はいずれの場合も leading鎖から転写される。

【００１４】このようにして作成したｐＴＣＳ－Ｋを、大腸菌ＫＨ１３８０（ｄｎａＱ４９）のｒｅｃＡ$^{+}$ 株であるＫＨ１３７９（ｄｎａＱ４９）に導入し、アンピシリン含有ＬＢ培地において２４℃で１６時間培養した。次いで、３７℃でさらに１６時間培養してｄｎａＱ４９の変異を誘導した。上記の各温度での培養ののち、アンピシリン単独またはアンピシリンとクロラムフェニコールを含有するＬＢ培地での生存菌の数を計測し、アンピシリン耐性菌に対するクロラムフェニコール耐性菌の割合としてＣｍ^{s} →Ｃｍ^{R} 変異率を算出した。

【００１５】結果は、表１に示したとおりであり、クロラムフェニコールに対する感受性（Ｃｍ^{s} ）から耐性（Ｃｍ^{R} ）への変異は lagging鎖側に遺伝子をコードするｐＴＣＳ－Ｋ１９群による形質転換菌のほうが leading鎖側にコードするｐＴＣＳ－Ｋ２０群によるそれよりも約１０倍も多いことが確認された。また、ｐＴＣＳ－Ｋ１９群とｐＴＣＳ－Ｋ２０群の変異発生率の差は、ｄｎａＱ４９の変異を誘導（３７℃培養）することによってさらに明瞭となった。

【００１６】

【表１】

プラスミド	複製と発現の方向	Ｃｍ耐性への変異率（×１０$^{-9}$）	
		24°C	37°C
	Ori　*Cm*		
pTCS-K20		3	94
pTCS-K1	➡ ⬅	8	60
pTCS-K44		7	110
pTCS-K34		8	83
pTCS-K19		45	1100
pTCS-K2	➡ ➡	55	1200
pTCS-K47		21	1300
pTCS-K31		37	800

＊【００１７】次に、ｐＴＣＳ－Ｋ１９とｐＴＣＳ－Ｋ２０とをそれぞれ導入したＫＨ１３７９の形質転換体を、アンピシリン含有ＬＢ培地において２４℃で５時間培養したのち、３７℃の培養条件に移し、ｄｎａＱ４９の変異を誘導してＣｍ^r への変異菌を計測した。計測は、クロラムフェニコールおよびアンピシリン含有ＬＢ培地上で熱誘導から１時間毎に、ＯＤ$_{550}$ の吸光度を測定することによって行った。

【００１８】結果は、表２に示したとおりであり、ｐＴＣＳ－Ｋ１９とｐＴＣＳ－Ｋ２０の各々の形質転換菌における変異菌発生率の差は、熱による変異誘導の時間増加に伴って大きくなり、６時間以降からは８倍以上にもなった。

【００１９】

【表２】

＊

３７℃での培養時間	OD$_{550}$		Ｃｍ耐性への変異率（×１０$^{-8}$）		
	K19	K20	K19	K20	比率(K19/K20)
0	0.34	0.33	–	–	–
1.0	1.70	1.68	40.0 ± 13.6	18.9 ± 4.4	2.1
2.0	2.70	2.65	118.3 ± 57.0	44.7 ± 5.2	2.6
3.0	3.90	4.00	249.1 ± 23.5	77.8 ± 60.2	3.2
4.0	4.60	4.50	271.1 ± 16.8	80.0 ± 44.0	3.4
5.0	5.20	5.30	256.5 ± 92.1	40.6 ± 29.8	6.3
6.0	5.60	5.50	174.1 ± 29.5	21.6 ± 1.3	8.1
7.5	6.90	6.70	70.7 ± 8.4	8.3 ± 2.4	8.5
9.5	7.20	7.20	67.1 ± 2.6	8.1 ± 0.3	8.3

【００２０】以上の結果から、複製時に leading合成されるＤＮＡ鎖に比べ、 lagging合成されるＤＮＡ鎖では、遥に高い割合で遺伝子ＤＮＡの変異が発生することが確認された。

【００２１】

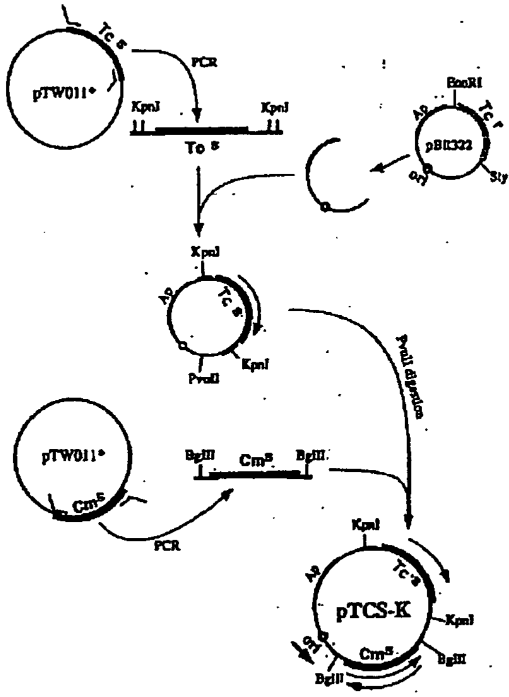
【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明のＤＮＡ複製モデルにより、ゲノムＤＮＡの分裂・複製時における突然変異発生率が、連続（ leading）合成と不連続（lagging）合成とで異なるという変異不均衡説が生物系において証明される。これによって、進化工学に新たな可能性が拓かれる。また、このＤＮＡ複製モデルの構成を利用して、レポーター遺伝子の代わりに有用遺伝子を接続すれば、その変異配列を効率良く得ることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

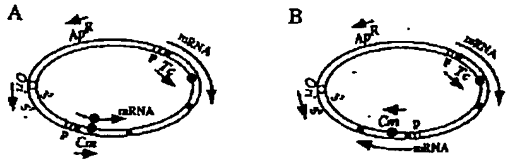
【図１】この発明のＤＮＡ複製モデルに用いる組換え体プラスミドの作成工程を示した模式図である。

【図２】Ａは組換え体プラスミドｐＴＣＳ－Ｋ１９の構造図であり、ＢはｐＴＣＳ－Ｋ２０の構造図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
// C12N　1/21		8828－4B		
(C12N　15/09				
C12R　1:19)				
(C12Q　1/68	Z			
C12R　1:19)				
(C12N　1/21				
C12R　1:19)				
			C12R　1:19)	

(71)出願人　592102906
古沢　満
東京都江戸川区西葛西6－6－8　西葛西パークフアミリア605

(71)出願人　000005223
富士通株式会社
神奈川県川崎市中原区上小田中4丁目1番1号

(72)発明者　今本　文男
大阪府吹田市古江台1丁目9の3

(72)発明者　石野　良純
滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号　寶酒造株式会社内

(72)発明者　古沢　満
東京都江戸川区西葛西6－6－8　西葛西パークファミリア605

(72)発明者　土居　洋文
神奈川県川崎市中原区上小田中1015　富士通株式会社内

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☑ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: ______________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.